

Cara uji kimia – Bagian 10 : Penentuan kadar histamin dengan Spektrofotometri dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) pada produk perikanan



© BSN 2016

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
Pendahuluan.....	iii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Prinsip metode pengujian	1
4 Penentuan histamin secara spektrofotometri	2
5 Penentuan histamin secara KCKT.....	4
6 Pelaporan	7
7 Keamanan dan keselamatan kerja	7
Lampiran A (informatif) Validasi metode penentuan histamin dengan KCKT	8
 Tabel A.1 Hasil uji LOD dan LOQ.....	 9
Tabel A.2 - Data uji akurasi spike sampel 50 mg/kg (50 g + 2,5 mL larutan standar histamin 1000 mg/L).....	9
Tabel A.3 - Data uji akurasi spike sampel 100 mg/kg (50 g + 5 ml Standar Baku Histamine 1000 mg/l).....	10
Tabel A.4 Data uji akurasi spike sampel Spike Sampel 150 mg/kg (50 g + 7,5 mL Standar Baku Histamine 1000 mg/L)	11
Tabel A.5 - Nilai minimum recovery metode	11
Tabel A.6 - Horwitz Value	12
Gambar A.1 - Kurva kalibrasi larutan standar histamin	8
Gambar A.2 - Kurva kalibrasi spike sampel.....	8

Prakata

Dalam rangka memberikan jaminan mutu dan keamanan pangan komoditas hasil perikanan yang akan dipasarkan di dalam dan luar negeri, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) metode uji yang dapat memenuhi jaminan tersebut.

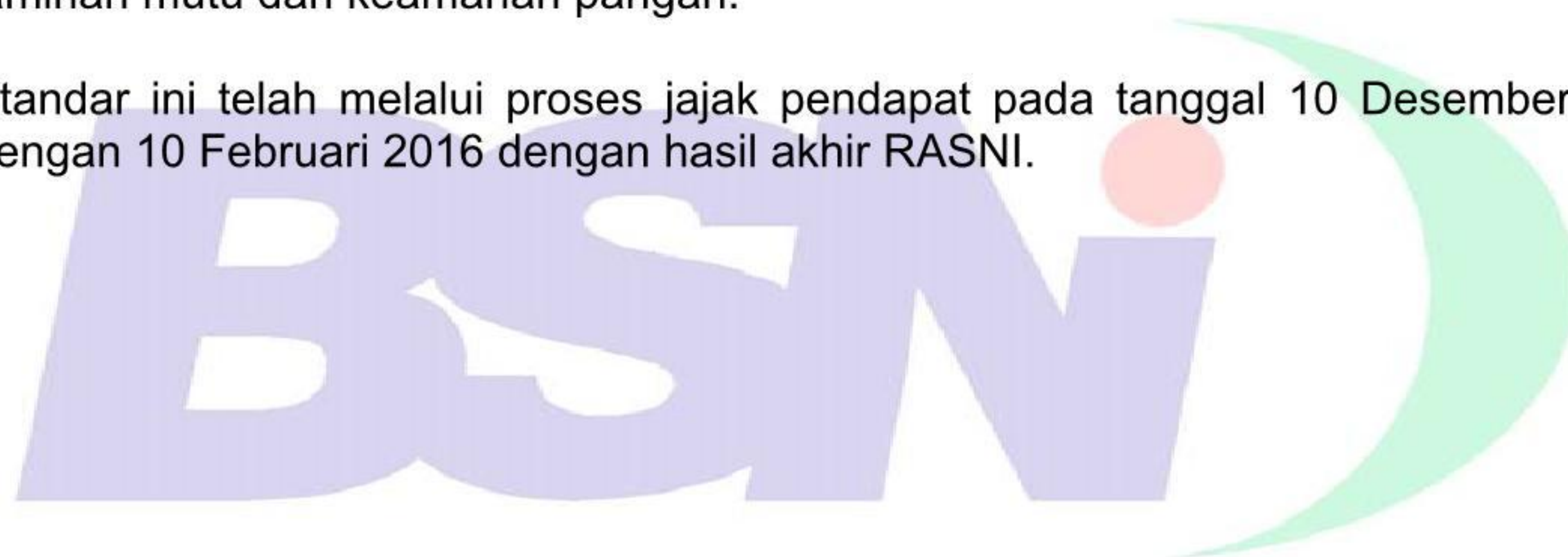
Standar ini merupakan revisi dari *SNI 2354.10:2009, Cara uji kimia - Bagian 10 : Penentuan kadar histamin dengan spektrofotometri dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) pada produk perikanan*.

Perubahan yang mendasar pada standar ini antara lain:

1. Preparasi contoh pada uji histamin metode KCKT,
2. Penambahan perhitungan hasil,
3. Penambahan Lampiran informatif.

Standar ini disusun oleh Komite Teknis 65-05: Produk Perikanan, yang telah dirumuskan melalui rapat teknis, dan rapat konsensus pada tanggal 17 September 2015 di Bogor dihadiri oleh anggota Komite Teknis 65-05: Produk Perikanan sebagai upaya untuk meningkatkan jaminan mutu dan keamanan pangan.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 10 Desember 2015 sampai dengan 10 Februari 2016 dengan hasil akhir RASNI.



Pendahuluan

Penyusunan SNI ini, memperhatikan ketentuan dalam Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI Nomor PER.19/MEN/2010 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan





Cara uji kimia - Bagian 10 : Penentuan kadar histamin dengan spektrofotometri dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) pada produk perikanan

1 Ruang lingkup

Standar ini digunakan untuk menentukan kadar histamin pada produk perikanan.

2 Istilah dan definisi

2.1

histamin

merupakan senyawa turunan dari asam amino histidin yang terbentuk karena tindakan bakteri yang memiliki *enzym dekarboksilase*

2.2

fluorometri

metode analisa yang didasarkan pada pengukuran *fluorosensi*

2.3

metode analisa secara KCKT

suatu teknik analisa kuantitatif dan kualitatif yang didasarkan pada pemisahan zat terlarut oleh suatu proses migrasi deferensial dinamis dalam sistem yang terdiri dari dua fase. Salah satunya adalah fase cair yang bergerak secara berkesinambungan dalam arah tertentu dan didalamnya zat-zat terpisah menunjukkan perbedaan mobilitas karena perbedaan *absorpsi*, partisi, kelarutan, tekanan uap, ukuran molekul dan muatan ion

3 Prinsip metode pengujian

3.1 Secara spektrofotometri

Histamin diekstrak dari jaringan daging contoh menggunakan metanol dan sekaligus mengkonversi histamin ke dalam bentuk OH. Zat-zat histamin selanjutnya dimurnikan melalui resin penukar ion dan diubah ke bentuk derivatnya dengan senyawa Orto-ptalaldikarbosilaldehid (OPT). Besarnya fluoresensi histamin diukur secara fluorometri pada panjang gelombang eksitasi 350 nm dan emisi 444 nm.

3.2 Secara KCKT

Histamin diekstrak dari jaringan daging contoh menggunakan TCA 10% selanjutnya diderivatisasi dengan senyawa orto-ftalaldehid (OPA). Besarnya histamin diukur secara KCKT dengan detektor fluoresens pada panjang gelombang eksitasi 350 nm dan emisi 450 nm dengan menggunakan fase gerak campuran asetonitril : larutan dapar monosodium fosfat (30 : 70) dan kolom C-18. Respon KCKT berupa puncak-puncak kromatogram yang mempunyai waktu tambat (RT) yang spesifik. Identifikasi puncak dilakukan dengan membandingkan RT sampel terhadap RT standar. Luas puncak sebanding dengan jumlah analit tersebut.

4 Penentuan histamin secara spektrofotometri

4.1 Peralatan

- Corong dan botol filtrat contoh;
- Homogenizer (blender);
- Kertas saring kasar, plastik, karet pengikat;
- Kolom resin 20 cm x 0,8 cm, reservoar 2 cm x 5 cm;
- Labu takar 25 mL, 50 mL, 100 mL dan 1.000 mL;
- Pipet volumetric;
- Spektrofotometer;
- Stirrer-plate*;
- Tabung reaksi 50 mL bertutup;
- Timbangan analitis;
- Waterbath*.

4.2 Pereaksi

- Metanol;
- Aquades;
- Glasswool;
- NaOH 1 N;
Larutkan 4 g NaOH dalam 100 mL aquades.
- HCl 0,1 N;
Encerkan 8 mL HCl 12,5 N (37%) dalam 1.000 mL aquades.
- Orto-ptalatdikarbosilhid (OPT) 0,1%;
Larutkan 0,1 g OPT dalam 100 mL metanol, larutan ini disiapkan pada kondisi segar dalam setiap analisa.
- Asam Fosfat (H_3PO_4) 3,57 N;
Encerkan 121,8 mL H_3PO_4 (85%) menjadi 1.000 mL aquades, standarkan larutan ini dengan mengambil 5 mL dan titrasi dengan NaOH 1 N dengan indikator fenolftalin.
- Resin penukar ion jenis Dowex 1 – X8 50 – 100 mesh;
- Pembuatan larutan standar histamin:
Larutan stok 1 mg/mL (1.000 ppm)
Timbang teliti 169,1 mg histamin 2 HCl (Histamin dihidroklorid), larutkan dan tepatkan menggunakan HCl 0,1 N dalam labu takar 100 mL sampai batas volume.
Siapkan larutan ini dalam kondisi segar setiap minggu dan disimpan dalam refrigerator.
larutan stok 10 µg/mL (10 ppm)
Pipet 1 mL larutan stok (1.000 ppm) masukkan ke dalam labu takar 100 mL dan tambahkan larutan HCl 0,1 sampai batas volume. Siapkan larutan ini dalam kondisi segar setiap minggu dan disimpan dalam refrigerator.
- Larutan kerja;
Buat larutan kerja 0,1 µg/mL (0,1 ppm); 0,2 µg/mL (0,2 ppm) dan 0,3 µg/mL (0,3 ppm).
Siapkan larutan kerja ini setiap hari (setiap akan digunakan). Apabila larutan kerja tersebut menghasilkan fluoresensinya yang maksimal pada pembacaan dengan instrumen, maka larutan kerja tersebut dapat diencerkan sesuai dengan keperluan.

4.3 Prosedur analisis

- Blender contoh hingga homogen.
- Timbang seksama lebih kurang 10 g contoh dalam *beaker glass* 250 mL dan tambahkan 50 mL metanol, blender hingga homogen.

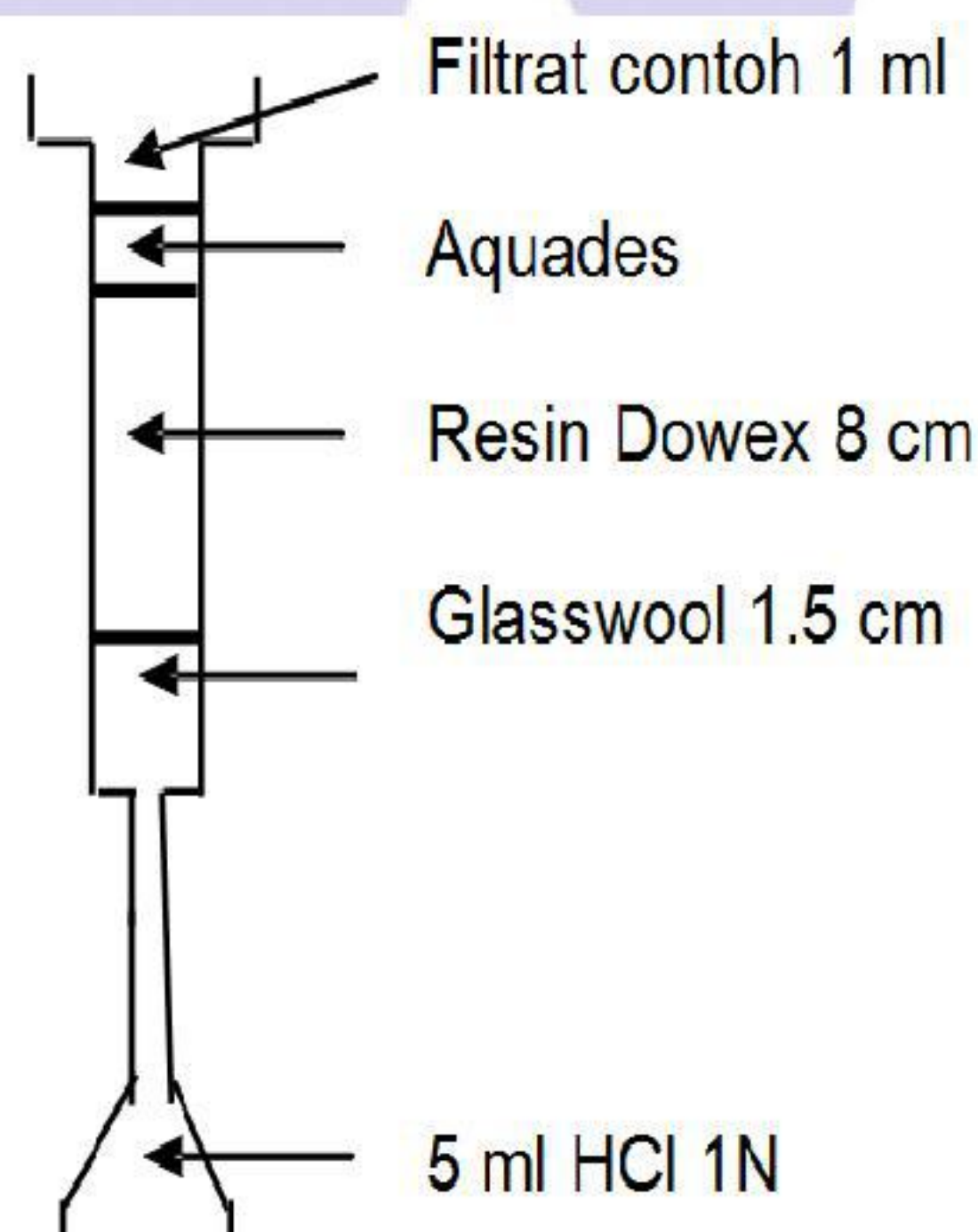
- c) Panaskan diatas *waterbath* selama 15 menit pada suhu 60 °C dijaga sampel dalam kondisi tertutup, dinginkan hingga suhu kamar.
- d) Tuangkan contoh ke dalam labu takar 100 mL dan tepatkan hingga volume labu dengan metanol.
- e) Saring menggunakan kertas saring dan filtratnya ditampung dalam botol contoh. Pada tahap ini filtrat contoh dapat disimpan dalam refrigerator.

4.3.1 Persiapan resin

- a) Timbang 3 g *resin* untuk setiap kolom dalam *beaker glass* 250 mL.
- b) Tambahkan 15 mL NaOH 2 N/g resin untuk mengubah *resin* menjadi bentuk OH.
- c) Aduk menggunakan *stirer-plate* selama 30 menit.
- d) Tuang cairan pada bagian atas dan ulangi penambahan NaOH 2 N dengan jumlah yang sama.
- e) Cuci/bilas resin dengan aquades sebanyak 3 kali.
- f) Saring melalui kertas saring No. 588 atau yang setara dan cuci kembali dengan aquades.
- g) Siapkan resin setiap minggu dan simpan dalam aquades.

4.3.2 Persiapan kolom resin

- a) Masukkan *glasswool* ke dalam kolom *resin* setinggi $\pm 1,5$ cm.
- b) Masukkan resin dalam medium air ke kolom resin setinggi ± 8 cm, pertahankan volume air yang berada diatas resin ± 1 cm, jangan dibiarkan kering.
- c) Letakkan labu takar 50 mL yang sudah berisi 5 mL HCl 1 N di bawah kolom resin guna menampung *elusi* contoh yang dilewatkan pada kolom resin. Diperlihatkan dalam Gambar 1.



Gambar 1 – Persiapan kolom resin

4.3.3 Pemurnian contoh

- a) Pipet 1 mL filtrat contoh, masukkan dalam kolom resin, kran kolom resin dalam posisi terbuka biarkan aliran menetes (hasil elusi) ditampung dalam labu takar 50 mL.

- b) Tambahkan aquades pada saat tinggi cairan ± 1 cm di atas resin dan biarkan cairan terelusi. Lakukan seterusnya hingga hasil elusi dalam labu takar tepat 50 mL. Hasil elusi (contoh) dapat disimpan dalam refrigerator.

4.3.4 Pembentukan senyawa turunan (derivatisasi)

Siapkan tabung reaksi 50 mL masing-masing untuk contoh, standar dan blanko.

- Pipet masing-masing 5 mL filtrat contoh, larutan standar kerja dan blanko (HCl 0.1 N)
- Tambahkan kedalam tabung reaksi diatas berturut-turut:
 - 10 mL HCl 0,1 N, kocok.
 - 3 mL NaOH 1 N, kocok, dalam waktu 5 menit harus sudah ditambah 1 mL OPT 0,1%, kocok dan biarkan selama 4 menit.
 - 3 mL H₃PO₄ 3,57 N, kocok.
- Lakukan pengukuran fluorosence terhadap contoh, standar dan blanko sesegera mungkin dengan alat spektrofotometer pada panjang gelombang eksitasi: 350 nm dan emisi: 444 nm dalam jangka waktu 90 menit.

4.4 Perhitungan

- a) Masukkan harga konsentrasi dan fluoresensi dari larutan standar kerja ke dalam program linier kalkulator. Nilai: koefisien korelasi regresi (r), slope (b) dari intersep (a) digunakan untuk menghitung konsentrasi contoh. Masukkan harga fluoresensi contoh ke persamaan regresi standar:

$$y = a + bx$$

keterangan:

y : fluoresensi contoh;

a : intersep;

b: slope;

x : konsentrasi contoh yang akan dihitung.

- b) Setelah didapat harga x, kalikan dengan faktor pengenceran dan kembalikan ke berat contoh. Nyatakan kandungan histamin dalam ($\mu\text{g/g}$) atau mg/kg contoh.

$$\text{Konsentrasi histamin } (\mu\text{g/g}) \text{ contoh} = A \times \frac{(\text{volume akhir (mL)} - \text{fp})}{\text{gram contoh}}$$

Keterangan:

A : Konsentrasi (X) yang didapat dalam perhitungan ($\mu\text{g/mL}$)

5 Penentuan histamin secara KCKT

5.1 Peralatan

- Homogenizer;
- Membran filter 0,45 μm ;
- Peralatan gelas. Gelas piala, tabung reaksi 50 mL, pipet, labu takar;
- Seperangkat peralatan KCKT dilengkapi dengan detektor fluoresen;
- Sentrifugal;
- Timbangan analitik;

- g) *Ultrasonick bath*;
- h) *Vortex*.

5.2 Pereaksi

- a) Larutan Asam Trikloroasetat (TCA) 10% untuk mengekstraksi contoh, 100 g TCA larutkan dengan 1 L aquabides (sedikit demi sedikit hingga larut sempurna);
- b) Larutan Asam Trikloroasetat (TCA) 10% dalam air pro KCKT;
Larutkan 10 g TCA dalam 100 mL air pro KCKT kemudian saring dengan membran filter 0,45 μm . Larutan ini digunakan untuk membuat dan mengencerkan larutan baku histamin.
- c) Air pro KCKT;
- d) Larutan OPA (orto-ftalaldehid);
Larutkan 20 mg OPA dalam 2 mL metanol, dalam setiap analisa larutan ini dibuat segar.
- e) NaOH 1 N,
larutkan 4 g NaOH dalam 100 mL air pro KCKT;
- f) HCl 3 N;
Encerkan 12 mL HCl 12,5 N (37%) dalam labu takar 50 mL.
- g) Asetonitril pro KCKT saring dengan membran filter PTFE;
- h) Larutan Natrium dihidrogen fosfat (NaH_2PO_4);
Larutkan 0,3449 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dalam 300 mL air pro KCKT saring dengan membran filter 0,45 μm , dalam setiap analisa larutan ini dibuat segar.
- i) Metanol pro KCKT;
- j) Larutan baku histamin;
- k) Larutan stok histamin 1 mg/mL (1.000 ppm);
Timbang seksama lebih kurang 169,1 mg histamin 2HCl (histamin dihidroklorid) larutkan dan tepatkan menggunakan larutan TCA 10% dalam labu takar 100 mL sampai batas. Simpan dalam refrigerator.
- l) Larutan baku 10 $\mu\text{g/mL}$;
Pipet 1 mL larutan stok (1.000 ppm) masukkan ke dalam labu takar 100 mL dan tambahkan larutan TCA 10% sampai batas. Larutan ini dapat digunakan maksimal satu minggu setelah dibuat.
- m) Larutan baku kerja. Buat larutan kerja 2,5 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ dan 20 $\mu\text{g/mL}$;
Siapkan larutan baku kerja ini dalam keadaan segar setiap akan digunakan.

5.3 Prosedur analisis

- a) Blender contoh hingga homogen.
- b) Timbang seksama lebih kurang 50 g contoh ke dalam gelas piala, tambahkan 100 mL TCA 10% kemudian blender.
- c) Pindahkan kedalam tabung reaksi 50 mL, sentrifugal pada 3.500 rpm selama 10 menit. Saring supernatan dengan membran filter 0,45 μm kemudian simpan pada suhu refrigerator ($\pm 4^\circ\text{C}$).
- d) Derivatisasi.
- e) Pipet masing-masing 135 μL larutan baku kerja dan filtrat contoh, masukkan kedalam tabung reaksi 10 mL.
- f) Tambahkan masing-masing kedalam larutan baku kerja dan filtrat contoh berturut-turut:
 - 1,86 mL air pro KCKT kemudian divortex.
 - 0,4 mL NaOH 1 N, biarkan selama 1 menit.
 - 0,1 mL larutan OPA, vortex dan biarkan selama 4 menit.
 - 0,2 mL HCl 3 N, vortex.
- g) Masukkan ke vial dan siap untuk diinjeksikan ke kromatograf.
- h) Lakukan pengerjaan blanko 135 μL Larutan Asam Trikloroasetat (TCA) 10% pengganti contoh dan dikerjakan seperti pengerjaan contoh.

- i) Injeksikan kedalam kromatograf secara berurutan larutan blanko baku, baku kerja dari konsentrasi terendah, blanko pereaksi dan contoh. Rekam area puncak kromatogram utama dari masing-masing larutan yang diinjeksikan.

5.4 Kondisi KCKT

- Detektor : fluoresens (high pressure xenon lamp).
- Eksitasi : 350 nm.
- Emisi : 450 nm.
- Kolom : C-18 (4,6 mm x 220 mm) terkemas dengan ukuran partikel 5 µm.
- Fase gerak : asetonitril : Natrium dihidrogen fosfat 50 mmol/l (30 : 70).
- Laju alir : 0,7 mL/menit.
- Volume injeksi: 20 µl.
- Pastikan peralatan KCKT berfungsi dengan baik dan lakukan uji kesesuaian sistem

5.5 Perhitungan

5.5.1 Perhitungan menggunakan 1 (satu) titik konsentrasi standar

$$\text{Kandungan histamin } (\mu\text{g/g}) = \frac{(A_C - A_{BPr})}{(A_S - A_{ABS})} \times \frac{C_{std} \times V_A}{W}$$

Keterangan:

A_C : Area contoh;
 A_{BPr} : Area blanko pereaksi;
 A_S : Area baku;
 A_{ABS} : Area blanko baku;
 C_{std} : Konsentrasi baku (µg/mL);
 V_A : Volume akhir (mL);
 W : Berat contoh (g).

5.5.2 Perhitungan menggunakan kurva standar

Masukkan harga konsentrasi dan luas area dari larutan standar kerja ke dalam program linear. Nilai koefisien korelasi regresi (r), kemiringan (slope) (b) dan intersep (a) digunakan untuk menghitung konsentrasi contoh. Masukkan luas area contoh ke persamaan regresi standar:

$$y = a + bx$$

Keterangan:

y : area contoh
 a : intersep;
 b : kemiringan (slope);
 x : konsentrasi contoh yang akan dihitung (µg/mL).

Setelah didapat nilai x, kalikan dengan volume akhir dan kembalikan ke berat contoh. Nyatakan kandungan histamin dalam (µg/g) atau (mg/kg) contoh.

$$\text{Kandungan histamin (mg/kg)} = \frac{A \times V_A}{W} \times \frac{1000}{1000}$$

Keterangan:

A : Konsentrasi (x) yang didapat dalam perhitungan ($\mu\text{g/mL}$)
 V_A : Volume akhir (mL);
W : Berat contoh (g).

6 Pelaporan

- a) Jika angka desimal kurang dari 5 maka pembulatan kebawah, tetapi bila lebih dari 5 pembulatan keatas.

CONTOH:

14,454 dibulatkan menjadi 14,45

14,466 dibulatkan menjadi 14,47

- b) Jika angka ke tiga di belakang koma 5, dan angka kedua genap, maka angka 5 tersebut menjadi hilang tetapi bila angka kedua ganjil maka pembulatan keatas.

CONTOH:

14,765 dibulatkan menjadi 14,76

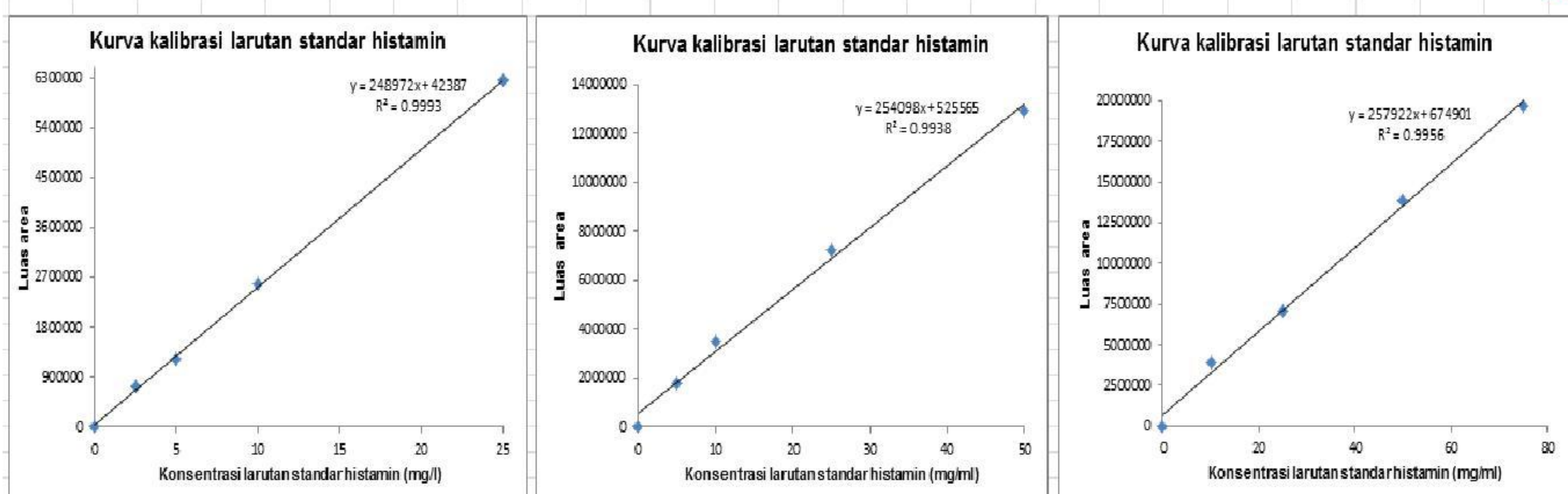
14,475 dibulatkan menjadi 14,48

7 Keamanan dan keselamatan kerja

Untuk menjaga keamanan dan keselamatan kerja selama melakukan analisa maka perlu diperhatikan hal-hal sebagai berikut:

- a) Cuci tangan sebelum dan sesudah melakukan analisa.
b) Gunakan jas laboratorium selama bekerja.

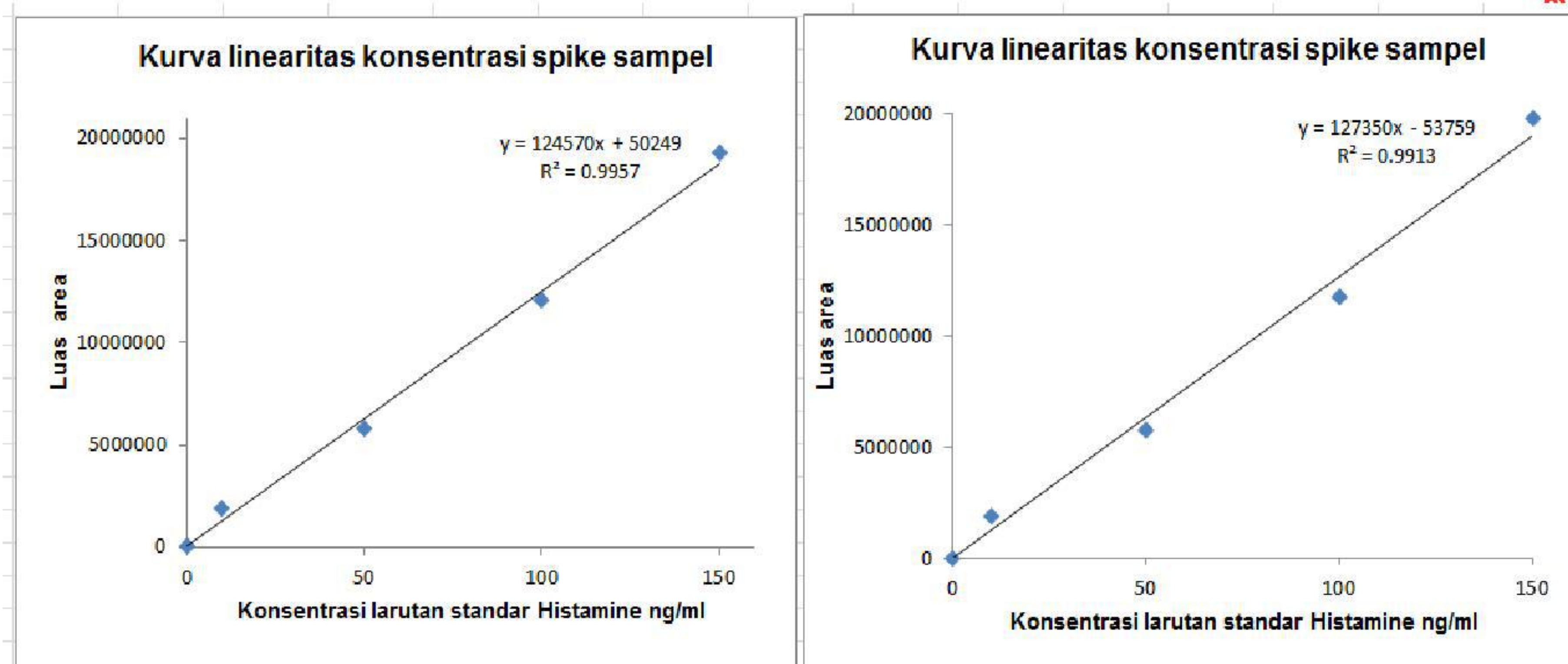
Lampiran A
(informatif)
Validasi metode penentuan histamin dengan KCKT

A.1 Uji linearitas**A.1.1 Linearitas Kurva Standar****Gambar A.1 - Kurva kalibrasi larutan standar histamin**

Kurva standar menunjukkan linearitas dengan koefisien korelasi regresi 0,9938 – 0,9993.

A.1.2 Linearitas Spike sampel

Uji linieritas dilakukan dari data spike sampel yang berasal dari data tabel uji akurasi, selanjutnya dibuat kurva antara konsentrasi spike (0; spike lod; 0,5 MRL; 1 MRL dan 1,5 MRL) versus area sampel. Nilai koefisien korelasi regresi adalah 0,9913 – 0,9957 seperti pada gambar kurva linearitas dibawah ini:

**Gambar A.2 - Kurva kalibrasi spike sampel**

A.2 Uji batas deteksi histamin

Tabel A.1 Hasil uji LOD dan LOQ

No.	Uraian	Luas Area						
		1	2	3	4	5	6	7
1	Spiked 10 µg/g	1884200	1886056	2000579	1732191	1807526	1769741	1917759
2	Blanko Sampel	196567	203321	193708	198069	200348	194063	197922
Kadar Spiked Sampel (µg/g) dan Kadar Blanko Sampel (µg/g)								
3	Kadar Spiked Sampel	9,96	9,97	10,58	9,16	9,55	9,35	10,13
4	Kadar Blanko Sampel	1,42	1,46	1,40	1,43	1,44	1,40	1,43
5	Rerata Luas Area Blanko Sempel	197714,000						
6	Rerata Luas Area Spiked 10 µg/g	1856864,571						
7	Rerata Kadar Spiked Sampel	9,81 µg/g						
8	Rerata Kadar Blanko Sampel	1,43 µg/g						
9	SD Blanko Sampel	0,024						
10	SD Spiked Sampel	0,490						
11	3 SD	0,073						
12	6 SD	0,146						
13	LOD	1,50 µg/g						
14	LOQ	1,57 µg/g						

Uji batas deteksi dilakukan dengan pengujian terhadap blanko sampel sebanyak tujuh kali ulangan (replikat), menghasilkan rata-rata konsentrasi 1,43 mg/kg dengan standar deviasi 0,024. Dari rata-rata tersebut maka dapat ditentukan batas deteksi (LOD = 1,50 mg/kg) dan batas determinasi (LOQ = 1,57 mg/kg).

A.3 Uji akurasi (% recovery) dan presisi (standar deviasi)

Uji akurasi dilakukan dengan pengujian terhadap blanko sampel yang telah diperkaya (dispike) larutan standar histamin 50 µg/g (2,5 mL dari 1000 mg/L) dilakukan 7 ulangan (replikat), disajikan dalam Tabel A.2:

Tabel A.2 - Data uji akurasi spike sampel 50 mg/kg (50 g + 2,5 mL larutan standar histamin 1000 mg/L)

Standar Baku µg/mL	Luas Area
0	0
2.5	737250
5	1211639
10	2594909
25	6249436
Intercept (a)	42387,361
Slope (b)	248971,699
R ²	0,9993

No.	Nama Sampel	Bobot (g)	Luas Area	Volume akhir (mL)	Konsentrasi sampel (µg/mL)	Kadar Histamine awal (µg/g)	Kadar Blanko (µg/g)	Kadar Histamine (µg/g)	Recovery (%)
1	Blanko	50,0528	244875	100	0,8133	-	1,62	-	-
2	Spike Sampel-1	50,0874	5786452	100	23,0712	46,06	-	44,44	88,87
3	Spike Sampel-2	50,0265	5743353	100	22,8980	45,77	-	44,15	88,29
4	Spike Sampel-3	50,0632	5780865	100	23,0487	46,04	-	44,41	88,83
5	Spike Sampel-4	50,0155	5244522	100	20,8945	41,78	-	40,15	80,30
6	Spike Sampel-5	50,0537	5689004	100	22,6798	45,31	-	43,69	87,37
7	Spike Sampel-6	50,0187	5368548	100	21,3926	42,77	-	41,14	82,29
8	Spike Sampel-7	50,0259	5600049	100	22,3225	44,62	-	43,00	85,99
							Rata-rata	43,00	85,99
							SD	1,7034	3,4069
							% RSD	3,96	3,96

Dari hasil uji akurasi diperoleh % recovery rata – rata 85,99%.

Uji akurasi dilakukan dengan pengujian terhadap blanko sampel yang telah diperkaya (dispike) larutan standar histamin 100 µg/g (5 mL dari 1000 mg/L) dilakukan 7 ulangan (replikat), disajikan dalam Tabel A.3

Tabel A.3 - Data uji akurasi spike sampel 100 mg/kg (50 g + 5 mL Standar Baku Histamine 1000 mg/L)

Standar Baku µg/mL	Luas Area
0	0
5	1793099
10	3510049
25	7224836
50	12968622
Intercept (a)	525564,521
Slope (b)	254097,593
R ²	0,9938

No.	Nama Sampel	Bobot (g)	Luas Area	Volume Akhir (mL)	Konsentrasi Sampel (µg/mL)	Kadar Histamine Awal (µg/g)	Kadar Blanko (µg/g)	Kadar Histamine (µg/g)	Recovery (%)
1	Blanko Sampel	50,0714	353310	100	0,9083	-	1,81	-	-
2	Spike Sampel-1	50,0528	11995583	100	45,1402	90,19	-	88,37	88,37
3	Spike Sampel-2	50,0314	11340199	100	42,5609	85,07	-	83,25	83,25
4	Spike Sampel-3	50,0207	11720046	100	44,0558	88,08	-	86,26	86,26
5	Spike Sampel-4	50,0502	12103712	100	45,5658	91,04	-	89,23	89,23
6	Spike Sampel-5	50,0318	12087635	100	45,5025	90,95	-	89,13	89,13
7	Spike Sampel-6	50,0701	11586797	100	43,5314	86,94	-	85,13	85,13
8	Spike Sampel-7	50,0417	11159326	100	41,8491	83,63	-	81,81	81,81
							Rata-rata	86,17	86,17
							SD	2,9306	2,9306
							% RSD	3,40	3,40

Dari hasil uji akurasi diperoleh % recovery rata – rata 86,17%.

Uji akurasi dilakukan dengan pengujian terhadap blanko sampel yang telah diperkaya (dispike) larutan standar histamin 150 µg/g (7,5 mL dari 1000 mg/L) dilakukan 7 ulangan (replikat), disajikan dalam Tabel A.4.

Tabel A.4 Data uji akurasi spike sampel Spike Sampel 150 mg/kg (50 g + 7,5 mL Standar Baku Histamine 1000 mg/L)

Standar Baku µg/mL	Luas Area
0	0
10	3891751
25	7127640
50	13928487
75	19694147
Intercept (a)	674900,786
Slope (b)	257922,007
R ²	0,9956

No.	Nama Sampel	Bobot (g)	Luas Area	Volume Akhir (mL)	Konsentrasi Sampel (µg/mL)	Kadar Histamine awal (µg/g)	Kadar Blanko (µg/g)	Kadar Histamine (µg/g)	Recovery (%)
1	Blanko Spike	50,0473	315746	100	0.9168		1,83	-	-
2	Spike Sampel-1	50,0237	19201838	100	71.8315	143,60	-	141,76	94,51
3	Spike Sampel-2	50,0721	18222093	100	68.0329	135,87	-	134,04	89,36
4	Spike Sampel-3	50,0320	19822754	100	74.2389	148,38	-	146,55	97,70
5	Spike Sampel-4	50,0529	18960982	100	70.8977	141,65	-	139,81	93,21
6	Spike Sampel-5	50,0296	17738536	100	66.1581	132,24	-	130,41	86,94
7	Spike Sampel-6	50,0652	19118505	100	71.5085	142,83	-	141,00	94,00
8	Spike Sampel-7	50,0613	18124113	100	67.6531	135,14	-	133,31	88,87
							Rata-rata	138,13	92,08
							SD	5,6983	3,7989
							% RSD	4,13	4,13

Dari hasil uji akurasi diperoleh % recovery rata – rata 92,08%.

Hasil uji akurasi (% recovery) memenuhi kriteria persyaratan keberterimaan recovery untuk metode kuantitatif (CD 96/23/2002 dan CD 2002/657/EC) yaitu 80% sampai 120%.

Tabel A.5 - Nilai minimum recovery metode

Konsentrasi	Kisaran
≤ 1 µg/kg	50% - 80%
> 1 µg/kg - 10 µg/kg	70% - 80%
≥ 10 µg/kg	80% - 120%

Sumber : CD 2002/657/EC.

Nilai presisi (*relative standard deviation*/RSD) memenuhi persyaratan keberterimaan sesuai dalam Tabel Horwitz Value dibawah ini.

Tabel A.6 - Horwitz Value

Kisaran Konsentrasi	RSD (%)
1 (100%)	2
0,1	2,8
0,01 (%)	4
0,001 (g/kg)	5,6
0,00001	8
0,00001	11
1 mg/kg (ppm)	16
50 mg/kg	8,88
100 mg/kg	8
150 mg/kg	7,52
0,1 mg/kg	2,3
0,01 mg/kg	32
µg/kg (ppb)	45

Sumber : CD 2002/657/EC

Rumus CV Horvitz = $2^{(1-0,5 \log C)}$